



TITLE:

Novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cells with dihydropyrimidine dehydrogenase overexpression(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kikuchi, Osamu

CITATION:

Kikuchi, Osamu. Novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cells with dihydropyrimidine dehydrogenase overexpression. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19597>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	菊 池 理
論文題目	Novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cells with dihydropyrimidine dehydrogenase overexpression (ジヒドロピリミジン脱水素酵素の過剰発現を伴った 5-フルオロウラシル耐性ヒト食道扁平上皮癌細胞株の樹立)		
(論文内容の要旨)			
<p>5-フルオロウラシル(5-FU)は、食道扁平上皮癌（ESCC）に対する化学療法における重要な薬剤の一つで、主にチミジル酸合成酵素の阻害により抗腫瘍効果を発揮する。一方 5-FU は主に肝臓でジヒドロピリミジン脱水素酵素（DPD）による分解をうけ、α-fluoro-ureidopropionic acid（FUPA）を含む代謝物を生成し薬理活性を失うが、胃癌、頭頸部癌などでは、腫瘍中の DPD 高発現が 5-FU の奏効率低下、および予後不良に関与することが報告されている。しかし食道癌における DPD 発現についてはいまだ明らかでない。本研究では、<i>in vitro</i> において 5-FU 耐性 ESCC 細胞を樹立し、その 5-FU 耐性機序について検討した。</p> <p>ESCC 由来細胞株 TE-5 の培地中に 5-FU を $1\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ まで緩徐に濃度を上昇させながら持続的に添加して 8 か月間培養し、その中で増殖する細胞を 5-FU 耐性 ESCC 細胞（TE-5R）とした。WST-1 試験により 5-FU への感受性を評価したところ、TE-5 および TE-5R 細胞における 5-FU の IC_{50} 値は、それぞれ $3.6\pm 1.1\mu\text{M}$、$55.5\pm 10.1\mu\text{M}$ であり、TE-5R 細胞は TE-5 細胞に対し約 15.6 倍の 5-FU 耐性を示した。aCGH 法により TE-5R 細胞における遺伝子増幅の検討を行ったところ 1 番染色体短腕に限局性の遺伝子増幅部位があり、この中には <i>DPYD</i> 遺伝子が含まれていた。そこでリアルタイム PCR 法、およびウエスタンブロット法で DPD の mRNA および蛋白発現レベルを検討したところ、TE-5R 細胞における DPD の mRNA、蛋白発現レベルは、TE-5 細胞と比較して有意に上昇していた。TE-5 および TE-5R 細胞に $10\mu\text{M}$ の 5-FU を 24 時間曝露した際の細胞内 5-FU 及びその代謝産物である FUPA 濃度を質量分析法にて測定したところ、TE-5R 細胞における細胞内 5-FU 濃度は TE-5 細胞より有意に低値であり、一方、FUPA 濃度は有意に高値であった。このことから TE-5R 細胞では TE-5 細胞に比し 5-FU の分解が亢進していることが示唆された。次に TE-5 及び TE-5R に DPD 阻害剤を 5-FU とともに添加した。TE-5 細胞では DPD 阻害剤を投与しても 5-FU の IC_{50} 値に有意な変化は見られなかったが、TE-5R 細胞における IC_{50} 値は DPD 阻害剤添加により $59.0\pm 14.3\mu\text{M}$ から $20.8\pm 9.2\mu\text{M}$ へ有意に低下した（$p = 0.023$）。また、TE-5R 細胞に DPD 阻害剤を投与した際の細胞内 5-FU 濃度は、投与しない場合に比し有意に上昇し、また FUPA 濃度は有意に減少した。この結果は、DPD 阻害剤が DPD 高発現細胞における 5-FU 分解を有効に抑制したことを示唆している。</p>			

以上の研究により、5-FU 耐性 ESCC 細胞株 TE-5R の耐性機序に DPD 発現上昇が深く関与し、特に 5-FU・DPD 阻害剤併用療法が DPD 高発現を伴う 5-FU 耐性例に有用な治療法となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

5-FU は食道扁平上皮癌 (ESCC) の化学療法における重要な薬剤の一つである。種々の腫瘍で 5-FU 代謝経路の変化は 5-FU の奏効率低下、予後不良に関与するが ESCC における 5-FU 耐性機序は十分に明らかでない。本研究では 5-FU 耐性 ESCC 細胞における耐性機序を検討した。

ESCC 由来細胞株 TE-5 の培地中に 5-FU を緩徐に濃度を上昇させながら持続的に添加し 5-FU 耐性 ESCC 細胞株 (TE-5R) を樹立した。TE-5R 細胞は TE-5 細胞に対し IC50 値にて 15.6 倍の 5-FU 耐性を示した。TE-5R 細胞の 1 番染色体短腕には、5-FU の主たる代謝酵素 DPD をコードする DPYD 遺伝子を含む限局性の DNA コピー数増加を認めた。また TE-5R 細胞中の DPD に関する mRNA、蛋白発現レベルは TE-5 細胞より有意に高値であった。5-FU 曝露後の TE-5R 細胞内 5-FU 濃度は TE-5 細胞より有意に低値で、反対にその代謝産物 FUPA 細胞内濃度は有意に高値であった。TE-5R 細胞に 5-FU とともに DPD 阻害剤を添加すると、細胞内 5-FU 濃度上昇、FUPA 濃度減少を呈し、5-FU への抵抗性が改善した。これらの結果から DPD 高発現を伴う 5-FU 耐性 ESCC 例に 5-FU・DPD 阻害剤併用療法が有用な治療法となる可能性が示唆された。

以上の研究は 5-FU 耐性食道癌に対する薬剤耐性の解明に貢献し DPD を標的とする新たな治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 2 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。